

Untersuchungen zur
hyaluronidasehemmenden Wirkung
der aus einem
brasilianischen Moorkommen
extrahierten Huminsäuren

JOACHIM OSTERBURG

1967

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Untersuchungen zur hyaluronidasehemmenden
Wirkung der aus einem brasilianischen Moor-
vorkommen extrahierten Huminsäuren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von
Joachim Osterburg
aus
München

1967



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter : Priv.-Doz.Dr.med.H.Mathies
Mitberichterstatter : Prof.Dr.med.W.Seitz
Dekan : Prof.Dr.med.M.Kiese

Tag der mündlichen Prüfung : 11.7.1967

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Problematik.....	5
II. Methodik.....	6
III. Versuchsreihen.....	9
IV. Tabellen.....	11
V. Statistische Auswertung.....	17
VI. Diskussion.....	29
VII. Zusammenfassung.....	30
IIIX. Literaturverzeichnis.....	31

I. Problematik

In verschiedenen Literaturangaben wird auf die hyaluronidasehemmende Wirkung von Moorsubstanzen hingewiesen. Mathies¹, Mathies und v. Werther² und Rösch³ konnten diese Wirkung bei Moorsubstanzen verschiedener Herkunft finden. Besonders Hiller⁴ konnte für die Huminsäuren, die einen für die Wirkung der Moore wesentlichen Bestandteil darstellen, einen hyaluronidasehemmenden Effekt nachweisen. Dieser ist möglicherweise für die Therapie von rheumatischen Erkrankungen von Bedeutung. Die Zwischenzells substanz besteht aus drei wichtigen Bestandteilen: der Chondroitinschwefelsäure, der Mucoitinschwefelsäure, der Hyaluronsäure. Die Hyaluronidase depolymerisiert die Hyaluronsäure (Vierling⁵), dadurch entsteht ein vermehrter Abbau der Zwischenzells substanz. Außerdem findet man beim Rheumatismus neben einer erhöhten Hyaluronidaseaktivität^{6,7,8,9,10} auch eine erhöhte Kapillarpermeabilität^{11,12,13,14,15}. Diese Permeabilitätsstörung bedingt ein perivaskuläres Oedem, das den Gasaustausch zwischen Gewebe und Blut beeinträchtigt. Es kommt zu einer lokalen Hypoxaemie des Gewebes. Einige Autoren^{16,17,18} führen die entstehenden anatomischen und histologischen Veränderungen der Gewebe bei rheumatischen Prozessen auf die langandauernde Hypoxie zurück.

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, die aus einem Moorvorkommen in Südbasilien extrahierten Huminsäuren auf ihre hyaluronidasehemmende Aktivität im Tierversuch zu prüfen. Die Extraktion wurde von J O A C H I - M O V I T S (Universidade Santa Maria, Rio Grande do Sul, Südbasilien) durchgeführt. Es handelt sich um ein Moorvorkommen in der Hochebene von Serra Gerol in Rio Grande do Sul in Südbasilien. Es wurden Moorproben verschiedener Lagen entnommen und daraus Huminsäuren in

kristallisierter Form gewonnen.

Die extrahierten Huminsäuren wurden mit I und II bezeichnet. Von den beiden Huminsäuretypen wurden Versuche mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, davon vom Huminsäuretyp I bis zu einer Verdünnung von 1 : 500.

II. Methodik

Die kristallisierten Huminsäuren wurden, da sie nicht in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst werden konnten, in Tyloeschleim suspendiert. Dazu wurden sie im Mörser pulverisiert, davon 10 mg abgewogen und in 100 ml Tyloeschleim gegeben. Sodann wurde im Wasserbad kurz bis ca. 70°C erwärmt. Diese Lösung diente als Stammlösung, von ihr aus wurden durch entsprechendes Verdünnen mit Tyloeschleim Konzentrationen von 1:10 (= 0,001 mg Huminsäuren/0,1 ml), 1:100 (= 0,0001 mg Huminsäuren/0,1 ml) und 1:500 (= 0,00002 mg Huminsäuren/0,1 ml) angefertigt. Da die Huminsäuren nur suspendiert waren, wurde vor Gebrauch stets gut umgeschüttelt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung zu erreichen.

Als Versuchstiere dienten weiße männliche Ratten mit einem Gewicht von ca. 180 - 300 g. Die Bauchhaut der Tiere wurde mittels Pilca jeweils unmittelbar vor dem Versuch enthaart. Dies geschah mit besonderer Sorgfalt, um einerseits eine Verletzung der Epidermis zu vermeiden und andererseits sowohl alle Haare als auch Reste des Enthaarungsmittels vollständig von der Bauchhaut zu entfernen.

Die Narkose wurde mit Evipan-Na durchgeführt. In einer Dosierung von 0,4 ccm pro 100 g Tiergewicht (subcutan) wurde eine gute Narkosewirkung erreicht. Es wurde stets

nur eine frisch angesetzte 10% Evipan-Na Lösung verwendet. Bei längerer Versuchsdauer wurden kleinere Dosen, zwischen 0,1 - 0,2 ccm/100 g Tiergewicht, des Narkotikums nachgespritzt, um die Tiere ständig in einer entsprechenden Narkosetiefe zu halten, damit sie sich nicht bewegen konnten.

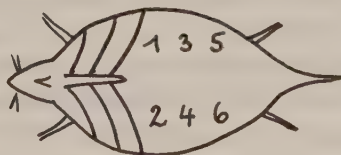
Als Maßstab für die Hyaluronidasehemmung diente der sogenannte Spreading-Test. Auf der enthaarten Bauchhaut der Tiere wurden mit einer 1 ccm-Tuberkulinspritze streng intracutane Quaddeln von 0,1 ccm Inhalt gesetzt. Zur Sichtbarmachung der Ausbreitung wurde 0,06% Evansblaulösung verwendet. Sie war der alleinige Inhalt der Farbstoffquaddeln. Für das Hyaluronidase-Farbstoffgemisch wurde in einer Ampulle Kinetin (= 150 I.E.) die Trockenmasse mit 2 ccm 0,06% Evansblaulösung aufgelöst. Somit kamen bei der Injektion von 0,1 ccm 7,5 I.E. im Gewebe zur Wirkung. Es wurden immer nur Quaddelpaare gesetzt, eine Farbstoff- (F) und eine Farbstoffhyaluronidasequaddel (FH). Für jede Versuchsreihe wurden sechs Ratten (als Tiere I-VI bezeichnet) verwendet, in deren Bauchhaut im Laufe des Versuchs pro Ratte jeweils nur drei Quaddelpaare injiziert wurden, bestehend aus den Vorquaddeln (F_v , FH_v) und zwei Quaddelpaaren entsprechender Zeiten (30, 60 min bzw. 90, 120 min bzw. 150, 180 min). Es wurde streng darauf geachtet, keine Quaddeln oberhalb des Rippenbogens und in die Leistenbeuge zu setzen. Um Fehler in der Ausbreitung der Quaddeln infolge der Lokalisation auf der Bauchhaut auszugleichen, wurden die Quaddeln systematisch an verschiedenen Stellen gesetzt. Als Anhalt hierfür diente nachfolgendes lateinische Quadrat. In diesem sind der Zeit 30 min die Zeiten 90 min und 150 min gleichzusetzen, ebenso der Zeit 60 min die Zeiten 120 min und 180 min. Die Zahlen 1 - 6 beziehen sich auf die Lokalisation der Quaddeln auf dem Rattenbauch

(vgl. nachfolgendes Schema).

Lateinisches Quadrat

	I	II	III	IV	V	VI (= Tiere)
1	FH ₆₀	F ₃₀	F ₆₀	F _v	FH _v	FH ₃₀
2	F ₃₀	F ₆₀	F _v	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀
3	F ₆₀	F _v	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀	F ₃₀
4	F _v	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀	F ₃₀	F ₆₀
5	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀	F ₃₀	F ₆₀	F _v
6	FH ₃₀	FH ₆₀	F ₃₀	F ₆₀	F _v	FH _v

Lokalisation der Quaddeln auf dem Rattenbauch



Die Quaddeln wurden immer nach 10 Minuten abgelesen, d.h. die Ausdehnung der Quaddeln wurde mit Tinte punktiert umrandet und daraufhin auf einen durchsichtigen Zellophanstreifen aufgekratzt. Diese Flächen wurden mittels eines Planimeters ausgemessen. Diese Werte liegen in den Tabellen vor, angegeben in mm². Nach dem Ablesen der Vorquaddeln erfolgte die Applikation der in Tyloseschleim suspendierten Huminsäuren intraperitoneal, jeweils 0,1 ccm der entsprechenden Suspension (1 : 10, 1 : 100 bzw. 1 : 500). Das Setzen weiterer Quaddelpaare erfolgte vom Zeitpunkt der Applikation der Huminsäuren aus gerechnet, also 30, 60, 90,

120, 150 und 180 Minuten danach (F_{30-180} und FH_{30-180}).

Die Angabe der Meßwerte erfolgte ebenfalls in mm^2 der Farbstoffausbreitung 10 Minuten nach Setzen der Quaddeln. Die Auswertung erfolgte als Mittelwertsdifferenz gegenüber dem Ausgangswert (F_v und FH_v).

III. Versuchsreihen

Als Vorversuche wurde der Tyloeschleim ohne Huminsäurebeigabe auf eine eventuelle hyaluronidasehemmende Wirkung an drei Ratten geprüft. Es wurde 0,1 ml Tyloeschleim intraperitoneal gegeben. Er zeigte keinerlei Einfluß, was sich aus den entsprechenden planimetrischen Werten ersehen läßt (Tabelle 1). Die Differenz der Mittelwerte sowohl der Farbstoff-, als auch der Farbstoffhyaluronidasequaddeln liegt im Bereich der Fehlerbreite.

Es wurden Versuchsreihen mit Huminsäuren vom Typ I in absteigenden Konzentrationen (1:10, 1:100 und 1:500) nach oben beschriebener Methodik durchgeführt, um feststellen zu können, bei welcher Verdünnung noch eine minimale hemmende Wirkung vorhanden ist.

1. Versuchsreihe

Zunächst wurde die Hyaluronidasehemmung 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Applikation bestimmt, mit einer Huminsäurekonzentration von 1:10 (= 0,001 mg Huminsäuren/0,1 ml). Die Ergebnisse liegen in Tabellen 2 a u. b und in Abbildung 1 vor.

2. Versuchsreihe

Mit einer Huminsäurekonzentration von 1:100 (= 0,0001 mg Huminsäuren/0,1 ml) wurden Versuche durchgeführt. 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der Applikation wurden Quaddelpaare gesetzt. (Tabelle 3 a u. b und Abb. 2)

3. Versuchsreihe

In dieser Versuchsreihe wurde eine Konzentration von 1:500 (= 0,0002 mg Huminsäuren/0,1 ml) verwendet und zugleich auch die Versuchszeit verlängert (150 und 180 Minuten). Es wurden also 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten nach der Applikation jeweils Quaddelpaare gesetzt. (Tabelle 4 a, b u. c und Abb. 3)

In den folgenden zwei Versuchsreihen wurde die hyaluronidasehemmende Wirkung der Huminsäuren vom Typ II untersucht.

4. Versuchsreihe

Es wurde eine Konzentration von 1:10 (= 0,001 mg Huminsäuren/0,1 ml) verwendet und 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Applikation Quaddeln gesetzt. (Tabelle 5 a u. b und Abb. 4)

5. Versuchsreihe

Die Zeiten wurden beibehalten, also 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der Applikation wurden Quaddelpaare gesetzt, aber die Konzentration von 1:100 (= 0,0001 mg Huminsäuren/0,1 ml) verwendet. (Tabelle 6 a u. b und Abb. 5)

IV. Tabellen

Tabelle 1

Tier	Gew. in g	F _v	F ₃₀	F ₆₀	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀
I	260	119	118	118	200	177	192
II	285	100	107	94	189	191	182
III	270	96	90	110	178	175	170
MW	272	105	105	107	189	181	181
D				2		- 8	- 8

MW = Mittelwerte der Einzelwerte

D = Differenz zum Ausgangswert der Mittelwerte (F_v
bzw. FH_v)

Tabelle 2a

Tier	Gew. in g	F _v	F ₃₀	F ₆₀	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀
I	250	81	79	100	200	149	187
II	235	107	95	94	200	185	135
III	310	116	105	112	223	170	164
IV	245	107	92	102	212	194	177
V	235	103	88	87	170	134	193
VI	305	110	104	103	198	160	178
MW	263	104	94	100	200	165	172
D			-10	- 4		-35	-28

Tabelle 2b

Tier	Gew. in g	F _v	F ₉₀	F ₁₂₀	FH _v	FH ₉₀	FH ₁₂₀
I	260	95	97	95	194	172	171
II	265	108	99	104	198	152	167
III	215	112	89	110	251	220	185
IV	255	123	99	107	190	167	190
V	280	134	111	111	196	164	177
VI	280	83	82	97	199	168	175
MW	259	109	96	104	205	174	177
D			-13	- 5		-31	-28

Tabelle 3a

Tier	Gew. in g	F _v	F ₃₀	F ₆₀	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀
I	230	88	96	99	200	208	181
II	325	97	90	99	144	169	148
III	270	120	98	119	177	190	154
IV	285	92	80	87	200	184	155
V	265	120	112	109	211	196	216
VI	265	96	93	96	195	166	153
MW	273	102	94	101	188	185	168
D			- 8	- 1		- 3	-20

Tabelle 3b

Tier	Gew. in g	F _v	F ₉₀	F ₁₂₀	FH _v	FH ₉₀	FH ₁₂₀
I	245	122	116	122	225	216	193
II	235	120	98	112	226	196	217
III	245	114	95	106	210	165	209
IV	260	109	100	106	216	196	213
V	255	139	114	102	199	186	162
VI	265	80	107	93	199	152	172
MW	250	116	105	107	212	185	194
D			-11	- 9		-27	-18

Tabelle 4a

Tier	Gew. in g	F _v	F ₃₀	F ₆₀	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀
I	225	100	121	127	194	242	198
II	285	136	110	121	214	194	191
III	235	109	124	112	217	237	193
IV	255	109	89	117	214	197	201
V	215	130	107	114	190	202	214
VI	265	148	106	110	213	186	171
MW	246	122	110	118	207	209	195
D			-12	- 4		2	-12

Tabelle 4b

Tier	Gew. in g	F _v	F ₉₀	F ₁₂₀	FH _v	FH ₉₀	FH ₁₂₀
I	230	137	114	134	243	204	167
II	265	111	133	120	205	199	219
III	215	111	115	101	228	182	205
IV	260	109	104	102	187	165	183
V	235	141	138	127	210	223	197
VI	235	125	108	121	244	229	240
MW	240	122	119	118	219	200	202
D			- 3	- 4		-19	-17

Tabelle 4c

Tier	Gew. in g	F _v	F ₁₅₀	F ₁₈₀	FH _v	FH ₁₅₀	FH ₁₈₀
I	330	131	116	86	201	160	153
II	310	119	114	126	227	202	204
III	315	140	116	109	233	195	170
IV	295	140	108	114	255	208	190
V	285	129	129	115	233	190	171
VI	325	129	126	120	230	178	212
MW	310	131	118	111	229	189	183
D			-13	-20		-40	-46

Tabelle 5a

Tier	Gew. in g	F _v	F ₃₀	F ₆₀	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀
I	290	134	140	121	236	263	205
II	310	111	99	113	202	138	160
III	300	123	119	105	231	199	171
IV	290	116	123	130	226	170	197
V	280	127	96	105	201	165	166
VI	300	125	107	106	162	174	200
MW	295	123	114	113	210	185	183
D			- 9	-10		-25	-27

Tabelle 5b

Tier	Gew. in g	F _v	F ₉₀	F ₁₂₀	FH _v	FH ₉₀	FH ₁₂₀
I	300	105	104	111	210	147	145
II	300	111	120	126	237	176	191
III	250	125	105	107	213	173	149
IV	270	126	113	122	195	151	164
V	310	122	119	114	205	166	205
VI	290	105	97	121	225	171	175
MW	286	116	110	117	214	164	171
D			- 6	1		-50	-43

Tabelle 6a

Tier	Gew. in g	F _v	F ₃₀	F ₆₀	FH _v	FH ₃₀	FH ₆₀
I	340	147	143	122	260	246	234
II	240	126	122	140	232	184	208
III	215	140	143	120	224	210	184
IV	230	140	99	122	228	207	211
V	200	128	130	118	240	203	209
VI	340	123	118	124	230	168	210
MW	260	134	126	124	235	203	209
D			- 8	-10		-32	-26

Tabelle 6b

Tier	Gew. in g	F _v	F ₉₀	F ₁₂₀	FH _v	FH ₉₀	FH ₁₂₀
I	320	137	122	105	225	203	170
II	290	132	108	113	240	189	213
III	330	132	129	112	190	220	159
IV	315	121	117	126	221	211	174
V	290	131	120	124	208	175	171
VI	340	107	121	92	198	181	172
MW	314	127	119	112	214	196	176
D			- 8	-15		-18	-38

V. Statistische Auswertung

1) Mathematisch statistische Methodik

Die vorliegenden Meßreihen werden zunächst durch die statistischen Maßzahlen, dem arithmetischen Mittel $\bar{x}$ und Standardfehler $s_{\bar{x}}$ beschrieben. Für die Prüfung von Unterschieden sind die Einflüsse versuchsbedingter Variabilitäten zu berücksichtigen. In einer zweifachen Varianzanalyse läßt sich die Gesamtvarianz nach drei Komponenten hin trennen und damit unter Berücksichtigung des Einflusses der Variabilität zwischen den Tieren und der Komponente zwischen den Stufen eine Restvarianz bestimmen, die als methodischer Fehler bezeichnet werden kann. Aus seinem Verhältnis zur Komponente zwischen den zeitlichen Beobachtungsstufen ist mittels des Quotiententests (empirische Prüfungsgröße $F_{\text{emp.}}$) nach Fischer auf tatsächlich bestehende Unterschiede zwischen der beobachteten Farbstoffausbreitung verschiedener Zeiten zu schließen, soweit die zugelassene Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 0,05$ in der zugehörigen Verteilung der Prüfgröße F nicht überschritten wird.

Als Ergebnisse der mathematisch statistischen Analyse sind die Freiheitsgrade FG der Varianzkomponenten, Mittlere Abstands-Quadrate MAQ , die empirischen Varianzquotienten $F_{\text{emp.}}$ sowie die daraus bestimmte Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben, die bedeutet, wie wahrscheinlich ein beobachteter Unterschied ist.

Die Ausbreitung der Quaddeln in $\%$ bezieht sich auf die Kontrollwerte K (entspricht F_v bzw. FH_v) vor der Applikation.

2) Statistische Bewertung und Interpretation der experimentellen Untersuchungen

I. Huminsäuren vom Typ I

Die Versuchsreihe zur Bestimmung der hyaluronidasehemmenden Wirkung der isolierten Huminsäuren vom Typ I in Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:500 über 120 bzw. 180 Minuten führte zu Farbstoffausbreitungen, deren Meßwerte sich statistisch wie folgt zusammenfassen lassen (Tab.7).

Die statistische Auswertung der einzelnen Reihen findet sich in Tabelle 8 - 10.

Tabelle 7

n	t	Farbstoff-Quaddeln			Farbstoffhyal.-Quaddeln		
		min	$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	Ausbrei- tung	$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$

I. Kontrollwerte K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung
bei Applikation von:

a) Huminsäuren Typ I, Verdünnung 1:10

6	K	104,0	4,9		200,5	7,2	
.	30	93,8	4,0	-10%	165,3	9,1	-17%
.	60	100,1	3,5	-4%	172,3	8,4	-14%
6	K	109,1	7,5		204,6	9,3	
.	90	96,1	4,0	-12%	173,8	9,6	-15%
.	120	104,0	2,7	-5%	177,5	3,5	-13%

b) Huminsäuren Typ I, Verdünnung 1:100

6	K	102,1	5,7		187,8	9,8	
.	30	94,8	4,2	-7%	185,5	6,5	-1%
.	60	101,5	4,5	-1%	167,8	10,7	-10%
6	K	114,0	7,9		212,5	4,9	
.	90	105,0	3,5	-8%	185,1	9,4	-13%
.	120	106,8	3,9	-7%	194,3	9,3	-9%

c) Huminsäuren Typ I, Verdünnung 1:500

6	K	122,0	7,6		207,8	4,8	
.	30	109,5	5,1	-15%	209,6	9,6	+1%
.	60	116,8	2,5	-5%	194,6	5,7	-6%
6	K	122,3	5,7		219,5	9,2	
.	90	118,6	5,6	-3%	200,3	9,8	-9%
.	120	117,5	5,4	-4%	201,8	10,5	-8%
6	K	131,3	3,2		229,8	7,0	
.	150	118,1	3,2	-10%	188,8	7,1	-18%
.	180	111,6	5,6	-15%	183,3	9,2	-20%

Tabelle 8: Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit Huminsäuren vom Typ I, Verdünnung 1:10

Beob.zeit in min	Varianz- komponente	FG	MAQ	F _{emp.}	Signifikanz- entscheidung mit P
---------------------	------------------------	----	-----	-------------------	---------------------------------------

Farbstoffquaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	<u>17</u>			
	zw.Tieren	5	231,20	5,23	P<0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	<u>2</u>	<u>158,00</u>	3,57	P<0,10 angedeut.
	Rest	10	44,20		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	<u>17</u>			
	zw.Tieren	5	354,00	5,47	P<0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	<u>2</u>	<u>257,00</u>	3,97	P<0,10 angedeut.
	Rest	10	64,60		

Farbstoffhyaluronidasequaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	<u>17</u>			
	zw.Tieren	5	293,40	0,62	P>0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	<u>2</u>	<u>2079,00</u>	4,44	P<0,05 signif.
	Rest	10	467,60		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	<u>17</u>			
	zw.Tieren	5	834,66	5,16	P<0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	<u>2</u>	<u>1702,16</u>	10,53	P<0,01 sehr sig.
	Rest	10	161,50		

Tabelle 9: Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit Huminsäuren vom Typ I, Verdünnung 1:100

Beob.zeit in min	Varianz- komponente	FG	MAQ	F _{emp.}	Signifikanz- entscheidung mit P
---------------------	------------------------	----	-----	-------------------	---------------------------------------

Farbstoffquaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	361,93	9,91	P<0,01
	<u>zw.Stufen</u>	2	98,91	2,70	P>0,10
	Rest	10	36,50		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	291,40	2,23	P>0,10
	<u>zw.Stufen</u>	2	136,00	1,04	P>0,10
	Rest	10	130,20		

Farbstoffhyaluronidasequaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	1104,20	5,11	P<0,05
	<u>zw.Stufen</u>	2	717,50	3,32	P>0,05
	Rest	10	215,70		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	794,00	3,83	P<0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	2	1161,00	5,61	<u>P=0,01</u> signif.
	Rest	10	206,80		

Tabelle 10: Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit
Huminsäuren vom Typ I, Verdünnung 1:500

Beob.zeit in min	Varianz- komponente	FG	MAQ	F _{emp.}	Signifikanz- entscheidung mit P
---------------------	------------------------	----	-----	-------------------	---------------------------------------

Farbstoffquaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	114,80	0,52	P>0,10
	zw.Stufen	2	236,50	1,09	P>0,10
	Rest	10	216,50		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	393,00	4,47	P<0,05
	zw.Stufen	2	38,00	0,43	P>0,10
	Rest	10	87,80		
K-150'-180'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	76,40	0,63	P>0,10 Effekt
	zw.Stufen	2	602,50	5,02	P<0,05 signif.
	Rest	10	119,80		

Farbstoffhyaluronidasequaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	245,20	0,74	P>0,10
	zw.Stufen	2	334,50	1,01	P>0,10
	Rest	10	328,50		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	1068,60	3,02	P<0,10
	zw.Stufen	2	682,00	1,93	P>0,10
	Rest	10	352,70		
K-150'-180'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	780,60	4,69	P<0,05 Effekt
	zw.Stufen	2	3873,50	23,30	P<0,001 sehr sig.
	Rest	10	166,20		

II. Huminsäuren vom Typ II

Die folgende Tabelle 11 gibt eine statistische Zusammenfassung der Meßwerte über die hyaluronidasehemmende Wirkung der Huminsäuren vom Typ II, in Verdünnung 1:10 und 1:100 über einen Versuchszeitraum von 120 Minuten.

Die Auswertung der einzelnen Reihen finden sich in Tabelle 12 und 13.

Tabelle 11

n	t	<u>Farbstoff-Quaddeln</u>			<u>Farbstoffhyal.-Quaddeln</u>		
		$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	Ausbreitung	$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	Ausbreitg./Hemmung

II. Kontrollwerte K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung bei Applikation von :

a) Huminsäuren Typ II, Verdünnung 1:10

6	K	122,6	3,3		209,6	11,2	
.	30	114,0	6,7	- 7%	184,8	17,5	-12%
.	60	113,3	4,2	- 8%	183,1	8,0	-13%
6	K	115,6	4,0		214,1	6,0	
.	90	109,6	3,7	- 5%	164,0	4,9	-23%
.	120	116,8	2,9	+ 1%	171,5	9,6	-20%

b) Huminsäuren Typ II, Verdünnung 1:100

6	K	134,0	3,9		235,6	5,3	
.	30	125,8	6,8	- 6%	203,0	10,8	-14%
.	60	124,3	3,2	- 7%	209,3	6,4	-11%
6	K	126,6	4,4		213,6	7,5	
.	90	119,5	2,8	- 6%	196,5	7,2	- 8%
.	120	112,0	5,1	-11%	176,5	7,6	-17%

Tabelle 12: Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit
Huminsäuren vom Typ II, Verdünnung 1:10

Beob.zeit in min	Varianz- komponente	FG	MAQ	F _{emp.}	Signifikanz- entscheidung mit P
---------------------	------------------------	----	-----	-------------------	---------------------------------------

Farbstoffquaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw. Tieren	5	250,00	2,51	P>0,05
	zw. Stufen	2	162,50	1,63	P>0,10
	Rest	10	99,30		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw. Tieren	5	108,20	1,72	P>0,10
	zw. Stufen	2	88,50	1,41	P>0,10
	Rest	10	62,90		

Farbstoffhyaluronidasequaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw. Tieren	5	1773,00	2,90	P>0,05
	zw. Stufen	2	1322,00	2,16	P>0,10
	Rest	10	612,20		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw. Tieren	5	544,20	2,86	P>0,05 Effekt
	zw. Stufen	2	4393,50	23,07	P<0,01 sehr sign.
	Rest	10	190,40		

Tabelle 13: Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit
Huminsäuren vom Typ II, Verdünnung 1:100

Beob.zeit in min	Varianz- komponente	FG	MAQ	F _{emp.}	Signifikanz- entscheidung mit P
---------------------	------------------------	----	-----	-------------------	---------------------------------------

Farbstoffquaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	141,00	0,95	P>0,10
	<u>zw.Stufen</u>	2	162,00	1,10	P>0,10
	Rest	10	147,60		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	137,00	1,45	P>0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	2	323,00	3,42	P<0,10 angedeut.
	Rest	10	94,40		

Farbstoffhyaluronidasequaddeln

K-30'-60'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	770,60	4,39	P<0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	2	1800,50	10,26	P<0,01 sehr sign.
	Rest	10	175,40		
K-90'-120'	<u>gesamt</u>	17			
	zw.Tieren	5	414,40	1,40	P>0,05 Effekt
	<u>zw.Stufen</u>	2	2076,00	7,05	P<0,05 signif.
	Rest	10	294,30		

Interpretation der Testergebnisse

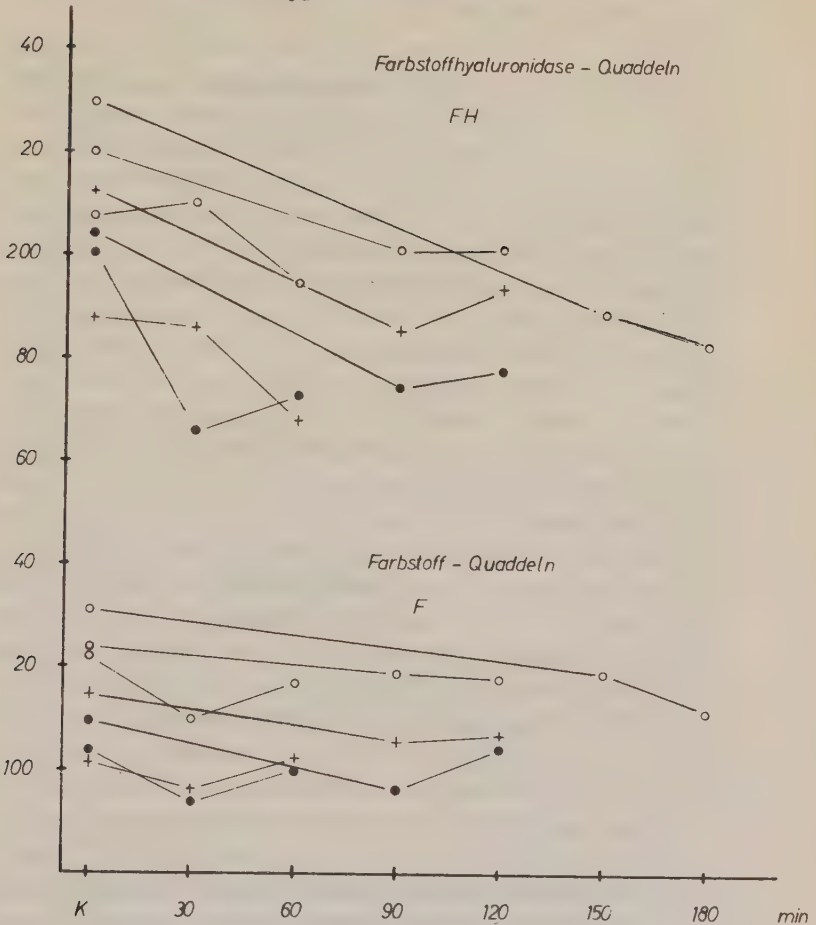
Die Farbstoffquaddeln der Versuchsreihen mit Huminsäuren vom Typ I deuten lediglich bei einer Verdünnung von 1:10 auf eine hemmende Wirkung. Dagegen zeigen die Farbstoffhyaluronidasequaddeln bei durchwegs doppelt so hohen Ausbreitungswerten eine gut gesicherte Aktivitätshemmung an ($P < 0,05$ und $P < 0,01$), die sich in der beobachteten Zeit nach Applikation zu verstärken scheint, 120 bis 180 Minuten nach Applikation bleibt dieser Hemmeffekt auch bei stärkerer Verdünnung 1:500 des Applikationsmediums deutlich sichtbar und zwar bei Farbstoffhyaluronidasequaddeln besser ($P < 0,001$) als bei bloßen Farbstoffquaddeln ($P < 0,05$).

Die vorangegangenen Tabellen 7-10 und die nachfolgenden Abbildungen 1-3 enthalten darüber die differenzierteren statistischen und graphischen Angaben.

Die Farbstoffquaddeln sprechen bei einer Verdünnung von 1:10 und 1:100 der Huminsäuren vom Typ II nicht an, deutlich dagegen die Farbstoffhyaluronidasequaddeln, insbesondere bei einer Verdünnung des Applikationsmediums von 1:100 ($P < 0,01$).

Differenziertere Angaben sind den vorangegangenen Tabellen 11-13 und den nachfolgenden Abbildungen 4 und 5 zu entnehmen.

Kontrollwerte K und Testergebnisse der Farbstoffausbreitung bei Applikation von Humin-säuren vom Typ I



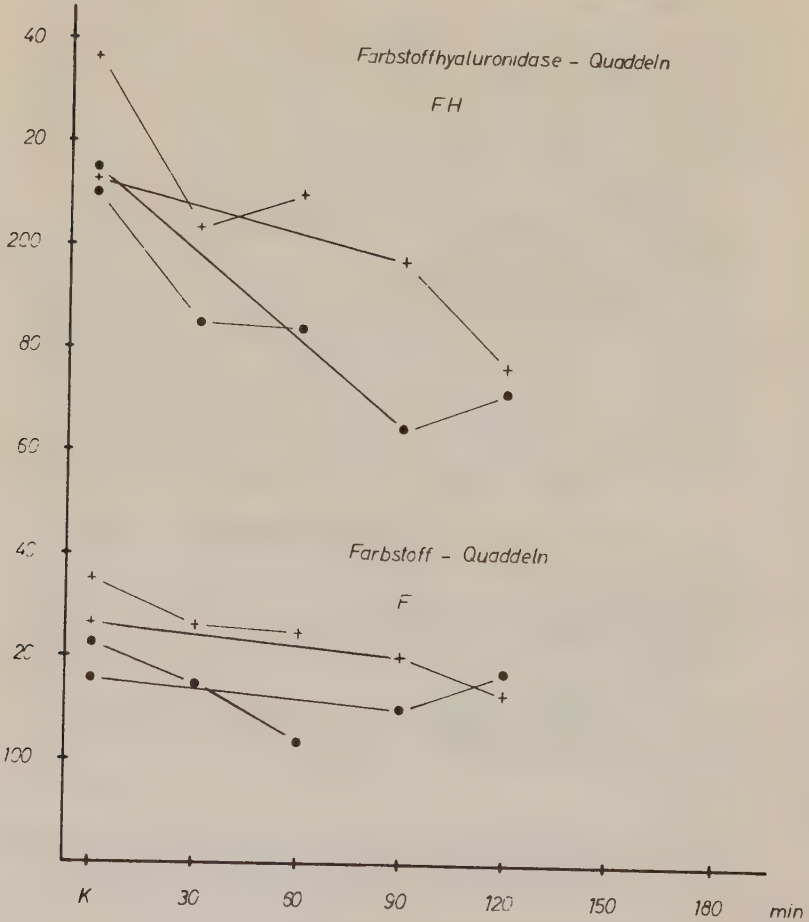
Zusammengefaßte Abbildungen 1 - 3 :

Verdünnungsreihe 1:10 bezeichnet mit ●

Verdünnungsreihe 1:100 bezeichnet mit +

Verdünnungsreihe 1:500 bezeichnet mit ○

Kontrollwerte K und Testergebnisse der Farbstoffausbreitung bei Applikation von Humin-säuren vom Typ II



Zusammengefaßte Abbildungen 4 und 5 :

Verdünnungsreihe 1:10 bezeichnet mit ●

Verdünnungsreihe 1:100 bezeichnet mit +

VI. Diskussion

Die extrahierten Huminsäuren aus beiden Moorproben des südbrazilianischen Moorkommens ergaben in der Verdünnung 1 : 10 der oben beschriebenen Stammlösung eine deutliche Hemmung der Hyaluronidaseaktivität. Die genannte Konzentration entspricht einer Wirksamkeit von 0,001 mg Huminsäure pro Versuchstier, bzw. von 0,0037 mg Huminsäure pro kg Tiergewicht bei einem mittleren Tiergewicht von 0,272 kg. Unterschiede zwischen den mit beiden Huminsäuretypen gewonnenen Ergebnisse bestehen insofern, als beim Typ II mit einer maximalen Mittelwertsdifferenz von 50 mm² eine stärkere Hemmung erreicht wurde als bei Typ I mit 35 mm². Ferner wurde der maximale Hemmwert bei Typ I bereits zum Zeitpunkt 30 min nach Huminsäureapplikation registriert, während er bei Typ II 90 min nach Huminsäureapplikation gemessen wurde. Die gefundenen Verhältnisse dieser Versuchsreihen sind in den Abbildungen 1 und 4 graphisch dargestellt. Entsprechend den Ergebnissen dieser Versuchsreihen zeigten auch bei einer Verdünnung von 1:100 (0,0001 mg Huminsäure/Tier, bzw. 0,00037 mg Huminsäure/kg Tiergewicht) die Huminsäuren vom Typ I eine schwächere Wirkung mit einem Maximalwert von 27 mm² gegenüber 38 mm² bei den Huminsäuren des Typ II (Abbildung 2 und 5). Von den schwächer wirksameren Huminsäuren des Typ I wurden außerdem Versuche in einer Verdünnung von 1:500 (0,00002 mg Huminsäure/Tier, bzw. 0,000073 mg Huminsäure/kg Tiergewicht) durchgeführt, die bis zum Zeitpunkt 120 min nach Huminsäureapplikation nur noch eine schwache hyaluronidasehemmende Wirkung zeigten, mit einem Maximalwert von 19 mm² zum Zeitpunkt 90 min nach Applikation. Bei Verlängerung der Versuchszeiten ergab sich jedoch eine später auftretende Hemmung der

Hyaluronidaseaktivität von 46 mm^2 zum Zeitpunkt 180 min nach der Applikation der Versuchssubstanz (Abbildung 3). Über diesen Zeitpunkt hinaus wurden die Untersuchungen nicht ausgedehnt, so daß nicht angegeben werden kann, ob der gemessene Wert den Maximalwert darstellt. Vergleicht man die gemessenen Werte im Versuchszeitraum aller Versuchsreihen, so ist bei einer Verdünnung von 1:500 nur noch eine schwache Wirksamkeit zu erkennen, die Untersuchungen zeigen jedoch, daß bei diesen vorerst nur gering wirksamen Substanzmengen zu einem späteren Zeitpunkt eine Hyaluronidasehemmung noch deutlich werden kann.

VII. Zusammenfassung

Der hyaluronidasehemmende Effekt des Moores wurde am Beispiel der brasilianischen Huminsäuren an Rattenversuchen nachgewiesen, unter Anwendung der auf dem Spreading-Effekt beruhenden Farbstoff-Farbstoffhyaluronidase-Quaddelmethode. Es konnte an Hand von absteigenden Verdünnungen (1:10, 1:100 und 1:500) gezeigt werden, daß die brasilianischen Huminsäuren eine deutliche hyaluronidasehemmende Wirkung haben, wie sie auch statistisch nachweisbar ist. Dies konnte sogar noch bei einer Verdünnung von 1:500, das entspricht einer Huminsäuremenge von $0,0002 \text{ mg}$ pro Tier, gefunden werden. Allerdings tritt diese geringe Wirksamkeit erst zu einem späteren Zeitpunkt auf. Die Versuche zeigen also, daß außerordentlich geringe Huminsäuremengen noch eine deutlich hyaluronidasehemmende Wirkung aufweisen können, wodurch die Wirksamkeit von Moorapplikationen verständlich wird, wie sie ebenfalls am Beispiel des Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Tests von Mathies und Mitarbeitern^{1,2,3} nachgewiesen wurde.

VIII. Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: Med. Mschr. 12 (1958), 685
- 2) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. f. angew. Bäder-
Klimaheilk. 5 (1958), 503
- 3) Rösch, U.: Diss. München 1959
- 4) Hiller, E.: zit. Schliephake, E. u. Smets, R.: Münch. med.
Wschr. 97, (1955), 56
- 5) Vierling, R.: Diss. München 1953
- 6) Hartmann, F. u. Matijevic, G.: Zschr. Rheumaforsch. 11
(1952), 23
- 7) Stepantschitz, G. u. Kresbach, E.: Zschr. Rheumaforsch. 13
(1954), 266
- 8) Jahnke, K. H.: Ärztl. Wschr. 6 (1951), 1153
- 9) Terbrüggen, A.: Dtsch. med. J. 5 (1954), 312
- 10) Tanjuchina, E. I.: Zschr. f. Rheumaforsch. Bd. 24, 3/4
(1965), 154
- 11) Eppinger, H.: Permeabilitätspathologie, Wien 1949
- 12) Schoen, R.: Dtsch. med. Wschr. 77 (1952), 558
- 13) Mathies, H.: Planta Medica 2 (1954), 129 u. 148
- 14) Mathies, H.: Hippokrates 23 (1952), 617
- 15) Slauck, A. u. Mahla, G.: Arzt u. Patient 63 (1950), 159
- 16) Terbrüggen, A.: Ärztl. Praxis 6 (1954), 40
- 17) Good, R.: Dtsch. med. Wschr. 76 (1951), 830
- 18) Leonhartsberger, F.: Münch. med. Wschr. 96 (1954), 987

Ich danke Herrn Priv.-Doz.Dr.med.H.M a t h i e s für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und Herrn Dr.R.J o a c h i m o v i t s,Universidade Santa Maria,Rio Grande do Sul,Südbrasilien,für die Isolierung der Huminsäuren und die Anregung zu diesem Thema.

Herrn Prof.Dr.med.W.S e i t z danke ich für die Möglichkeit, die Tierversuche an der Poliklinik der Universität München durchführen zu können.

Herrn Dipl.Math.W.J.Z i e g l e r ,Zürich,sage ich Dank für die statistische Berechnung.

Lebenslauf

Am 18. Februar 1940 wurde ich in Halle/Saale geboren. Meine Familie zog bereits im Sommer 1941 nach München, das von da ab unser ständiger Wohnsitz wurde. Ich besuchte in München die Volksschule und danach das Alte Realgymnasium. Im Juni 1960 bestand ich dort die Reifeprüfung mit Erfolg.

Im Anschluß daran wurde ich zur Bundeswehr, zu einer Sanitätseinheit, eingezogen.

Im Wintersemester 1961/62 begann ich mein Medizinstudium an der Universität München. Dort legte ich im Sommer 1962 das Vorphysikum und im Frühjahr 1964 die ärztliche Vorprüfung erfolgreich ab. Die klinischen Semester studierte ich ebenfalls in München.

Meine Famulaturzeit leistete ich zum Teil an den Universitätskliniken in München, zum Teil aber an auswärtigen, kleineren Krankenhäusern ab. Dazu war ich noch im Sommer 1965 für drei Monate an der Universitätsklinik von Philadelphia, USA, auf der chirurgischen Abteilung als Famulus beschäftigt.

Mein Staatsexamen werde ich im Frühjahr 1967 nach dem elften Semester in München ablegen.

